

「藻類・水圏微生物の機能解明と制御による
バイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」
平成23年度採択研究代表者

H23 年度 実績報告

太田啓之

東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター・教授

植物栄養細胞をモデルとした藻類脂質生産系の戦略的構築

§1. 研究実施体制

(1)「太田」グループ(東京工業大学)

① 研究代表者: 太田 啓之 (東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター、教授)

② 研究項目

- ・植物葉での栄養飢餓による脂質蓄積機構解明
- ・藻類での栄養飢餓による脂質蓄積機構解明
- ・モデル藻類共発現情報の取得
- ・マスター制御因子の同定
- ・有用藻類共発現情報の取得
- ・有用脂肪酸高生産系構築
- ・バイオディーゼル生産技術基盤構築

(2)「西田」グループ(埼玉大学)

① 主たる共同研究者: 西田 生郎 (埼玉大学・大学院理工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・小胞体膜脂質合成の解明と改変
- ・貯蔵脂質蓄積機構の解明と制御
- ・小胞体脂質合成の改変に基づく有用藻類貯蔵脂質の高生産化
- ・有用脂肪酸高生産系構築
- ・バイオディーゼル生産技術基盤構築

(3)「和田」グループ(東京大学)

① 主たる共同研究者:和田 元 (東京大学・大学院総合文化研究科、教授)

② 研究項目

- ・モデル藻類脂肪酸合成機構の解明
- ・特殊脂肪酸合成藻類の脂肪酸合成機構解明
- ・有用脂肪酸高生産系構築
- ・バイオディーゼル生産技術基盤構築

(4)「黒川」グループ(東京工業大学)

① 研究代表者:黒川 顕 (東京工業大学・大学院生命理工学研究科、教授)

② 研究項目

- ・モデル藻類共発現情報の取得
- ・有用藻類の網羅的ゲノム解読
- ・藻類比較ゲノムデータベース(Algaenome)の構築

(5)「大林」グループ(東北大学)

① 研究代表者:大林 武 (東北大学・大学院情報科学研究科、准教授)

② 研究項目

- ・モデル藻類共発現データ作成法の開発
- ・植物-モデル藻類比較共発現データベースの構築
- ・藻類比較共発現データベースの構築

(6)「佐藤」グループ(東京大学)

① 主たる共同研究者:佐藤 直樹 (東京大学・大学院総合文化研究科、教授)

② 研究項目

- ・モデル藻類脂質代謝フローの解析
- ・モデル代謝情報データベース構築
- ・有用藻類脂質代謝フローの解析と代謝情報データベース構築

(7)「尾崎」グループ(花王株式会社)

① 主たる共同研究者:佐藤 直樹 (花王株式会社・生物科学研究所、室長)

② 研究項目

- ・有用脂肪酸高生産藻類の探索・選定
- ・各種脂肪酸合成遺伝子の同定
- ・有用脂肪酸高生産系構築

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

(1) 太田グループ(東京工業大学)

1. 植物および藻類での栄養飢餓による貯蔵脂質蓄積機構の解明

平成 23 年度は太田らがすでに植物栄養細胞で明らかにした TAG 蓄積が増大する変異体(リン輸送体変異体 *pho1*, デンプン合成変異体 *pgm1*, リン欠乏時の糖脂質合成変異体 *pah1pah2*)の二重変異体、三重変異体の植物での単離を進めた。なお、これらの変異体での TAG 蓄積は、本 CREST 研究のベースとなった知見のひとつであり、CREST 研究開始前に国内特許申請済みで、平成 23 年度には外国出願を行った。

平成 23 年度はデンプン合成変異体 *pgm1* とリン欠乏時の糖脂質合成変異体 *pah1pah2* の 3 重変異体を取得した。3 重変異体の TAG 蓄積について調べたところ、3 重変異体は予想に反して *pgm1* に比べ、TAG 蓄積量が低下した。このことは PAH1, PAH2 が、葉での TAG 蓄積に必要なジアシルグリセロール(DAG)の提供に部分的に関与していることを示唆している。

また、モデル藻類 *Chlamydomonas* で栄養欠乏下での TAG 蓄積条件を詳細に検討し、発表した。

2. モデル藻類と有用藻類における共発現データの取得

モデル藻類 (*Chlamydomonas*, *Klebsormidium*) において TAG 蓄積の見られるリン欠乏条件などで発現情報を取得した。この結果を現在解析中であり、得られた解析データは黒川、大林が構築する比較ゲノムDB、比較共発現DBに提供する予定である。

3. 藻類貯蔵脂質合成に関わる主要酵素の機能解明

太田らは植物種子で TAG 合成遺伝子に関与することを見出しているホスファチジン酸ホスファターゼ PAH、既知の TAG 合成遺伝子であるジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ(DGAT1,2)の藻類遺伝子をすでに単離・同定しているが、*Chlamydomonas* で PAH は 1 遺伝子、DGAT1、DGAT2 はそれぞれ 1 遺伝子、5 遺伝子存在する。これらの藻類における TAG 蓄積での役割は全く不明である。*Chlamydomonas* における PAH のホモログに関しては遺伝子をすでに単離し、ノックダウン体の作成を行った。ノックダウン体では TAG の含量には大きな変化が認められなかったが、脂肪酸組成に変化が見られたことから、PAH は *Chlamydomonas* でも TAG 蓄積に部分的に寄与していると考えられる。現在 PAH ノックダウン体の詳細な解析を進めている。

(2) 西田グループ

1. 小胞体膜脂質合成の解明と改変

Chlamydomonas で DGTS の代わりに PC を蓄積させ、TAG へ変換させるための遺伝

子改変として、本年度は(1)シロイヌナズナ由来の PC 合成律速酵素 *AtCCT1* および *AtCCT2* 遺伝子の過剰発現、および(2)DGTS 合成酵素 *BTA1* の発現抑制のためのコンストラクト作成を行った。

(1) *AtCCT1*, *AtCCT2*, および PC 合成酵素遺伝子 *PCS* の cDNA を、*Chlamydomonas* 発現に最適化したコドンを用いて委託合成した。*Chlamydomonas* の過剰発現系で汎用される *HSP70A-RBCS2* プロモーター(pChOX ベクター)下流に、*AtCCT1* および *AtCCT2* の cDNA (ORF 領域) をサブクローニングし、過剰発現コンストラクトを作成した。さらに、pChOX:CCT2 については starchless 変異体 *sta6* を用いて独立した複数の形質転換ラインを得た。

(2) *BTA1* の発現抑制については、artificial microRNAs によるベクター作成 (*ChlamiRNA2-BTA1*)を進めている。

また、TAG 蓄積を調べる実験条件の検討のため、形質転換に汎用される細胞壁合成の変異体 (CC-503) を用い、窒素飢餓 3 日目の細胞をナイルレッド染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、オイルボディの数、サイズともに飢餓による増加が顕著に見られた。また、窒素飢餓 4 日目の細胞から総脂質を抽出し、中性脂質を TLC で展開分離した結果、窒素飢餓により TAG 蓄積量が増加していることを確認した。

(3) 和田グループ

1. 藻類脂肪酸合成機構の解明

葉緑体での脂肪酸合成は脂質合成の最初のプロセスであり、この脂肪酸の脂肪酸合成酵素などを介した合成機構および葉緑体から貯蔵脂質合成の場である小胞体への脂肪酸の振り分け機構を明らかにすることは、藻類を用いた貯蔵脂質の合成システムを確認する上で必要不可欠である。本年度は、脂肪酸の合成や振り分けに関わる遺伝子について、ゲノム配列がすでに決定されているモデル藻類である *Chlamydomonas reinhardtii* において探索し、それらの遺伝子産物の細胞内局在性や機能解析に着手した。また、脂質を効率よくかつ簡便に分析するために、光散乱検出器を有する HPLC 分析システムを構築した。これまでの脂質分析では、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって各脂質クラスに分離し、それらをガスクロマトグラフィーで定量する方法を使用していたが、分析に時間がかかり、TLC による各脂質の分離が不十分で測定誤差が大きいなどの問題があった。新システムの導入によってこれらの問題が解決できるものと考えられる。さらに、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を蓄積するペラゴ藻、*Sarchinochrysis marina* について、脂質代謝分析やゲノム解析についても着手した (太田グループと共同)。

(4) 黒川グループ(東工大生命理工)

1. 有用藻類の網羅的ゲノム解析

有用藻類のドラフトゲノム配列を得るために平成 23 年度に太田グループで導入した新型シーケンサー Illumina GAIIX の立上げを実施した。品質の高い配列情報を高い収量で得るため、DNA テンプレート量などの条件検討を実施している。また、藻類に適したゲノム解析パイプラインを構築するため、これまで構築してきた解析パイプラインの最適化を図った。具体的には、真核生物の遺伝子予測ツールとして実績のある Augustus をパイプラインに組み込み、より正確な遺伝子予測を可能とした。本研究で高等植物と藻類のゲノム情報をつなぐモデル藻類として発現解析を進める *Klebsormidium* のゲノム配列解読はほぼ終了しており、そこから得られた遺伝子情報からモデルを構築し、開発元ですでに準備されている *Chlamydomonas* の遺伝子モデルと併せて利用する事で、高精度な遺伝子予測を実現する。

2. 藻類比較ゲノムデータベース(Algaenome)の構築

モデル藻類である *Klebsormidium* では、完全ゲノム配列および遺伝子発現情報が得られている。これらをモデルデータとして、Algaenome の基盤とすべく解析を実施した。本ゲノム情報を、すでに公開されている他の藻類とゲノムレベルで比較し、得られた結果を表現可能なデータベースシステムを検討した。

また、一次共生藻のゲノム配列から予測した遺伝子群に、高精度なアノテーションを付加するため、国立遺伝学研究所の中村保一教授の協力の元、広域アノテーション支援システム TogoAnnotation に本ゲノム情報をアップロードし、高度なアノテーションを付加していく予定である。

(5) 大林グループ

モデル藻類である *Chlamydomonas* について、公共のデータベースに登録されている遺伝子発現データから共発現ネットワークの作成を試みた。世界最大の遺伝子発現リポジトリである NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)には *Chlamydomonas* の遺伝子発現測定用カスタムアレイが 12 種類あり、そこから共発現解析に利用可能な有効遺伝子数ならびに実験数の多い 4 つのプラットフォーム(GPL5914, GPL14721, GPL13913, GPL10173)を選択した。これらのプラットフォームの有効サンプル数はそれぞれ 42, 28, 18, 40 であり、有効遺伝子数は、3107, 12293, 12922, 7267 である。なおプローブと遺伝子の対応はプローブ配列をゲノムにマッピングすることで得た。各プラットフォームは特定の処理条件に集中しているため、それぞれから遺伝子共発現ネットワークを作成し、各ネットワークの重ね合わせによって、最終的な遺伝子ネットワークを作成した。マスター制御因子の候補として転写因子が想定されることから、シロイヌナズナとの相同性を基に *Chlamydomonas* 転写因子を推定し、179 遺伝子が転写因子候補として得られた。これらの候補因子の中で、*Chlamydomonas* 脂質合成系候補である 23 遺伝子と複数の共発現するものを探索したところ、2 つの転写因子が見つかった。

(6) 佐藤グループ

本年度は、脂質代謝ネットワークを解析するための、理論的な枠組みの構築と試行実験を行

った。研究のねらいは、細胞内脂質代謝系の流れが、細胞全体の活動と結びついているという認識のもとに、できるだけ自然に近い状態で、安定同位体 ^{13}C によるラベルを行い、その流れをどのように解析するのかという、基本的な枠組みを作ることであった。細胞内代謝が光合成によって駆動され、細胞活動を成立させる過程に含まれる創発的な過程を活用することが、物質生産の飛躍的な向上に重要であるということ、理論的な論文¹⁾にまとめた。光合成により $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ から炭酸固定された炭素の脂質への取り込みを測定すると、 ^{13}C 含量の異なる isotopomer の集団になる。この分子集団の数理的解析を独自のモデルに基づいて行い、ラベルの取り込みにおける濃縮比の分布を推定できる手法を考案し、ソフトウェアを開発した(未公表)。これを用いて、シアノバクテリアを例として、試行実験を行った。その結果、初期合成産物である飽和型グルコシル脂質から、多不飽和型ガラクト脂質への代謝の過程が、糖や脂肪酸の遊離なしにそのまま進行することを実証することに成功した。今後、同じ手法により、真核藻類において、膜脂質から TAG が作られる過程での分子再構築のようすを解析してゆく。さらに、シアノバクテリアにおいて報告されている脂肪酸の分泌に関連して、再アシル化酵素やリパーゼの変異株を作製した。今後、これらを用いたラベル実験も進めてゆく。一方、代表的な藻類の炭素代謝経路のすべての酵素について、その局在を確認して、代謝経路を構築する作業を進めた。

(7) 尾崎グループ(花王株式会社)

1. 有用脂肪酸高生産藻類の選定

まず化学反応性の高いヒドロキシ脂肪酸などの特殊脂肪酸類を簡便かつ効率的に分析するため、ヒドロキシ脂肪酸やエポキシ脂肪酸の存在が知られる植物(*Dimorphotheca sinuata*; dimorphecolic acid、*Wrightia tinctoria*; isoricinoleic acid、*Stokesia laevis*; vernonic acid)の種子抽出物を用いて、GC/MS 分析条件の検討を行った。この結果、各種子クロロホルム・メタノール抽出物をナトリウムメキシド法(Runzhi Li, et al., *Lipids*(2010) 45, 145)によりエステル化した後、DB-WAX カラム(J&W scientific 社製)を用いて GC/MS 分析を行うことで、それぞれ含有する上記ヒドロキシ及びエポキシ脂肪酸と推定されるピークが検出できた。次に検出ピーク同定のために GC/MS データベースを検索したところ、American Oil Chemists' Society の Lipid Library (<http://lipidlibrary.aocs.org/ms/masspec.html>) のスペクトライブラリーとの比較により検出ピークの同定が可能であることが明らかになった。

そこで保有する国立環境研究所(<http://mcc.nies.go.jp/>)からの購入藻類 98 株について、C 培地(淡水藻類)または f/2 培地(海産藻類)にて 20°C 、約 4,000lux、明暗 12 時間周期の条件で生育度が最大になるまで培養を行い、上記の方法で藻体含有脂肪酸の GC/MS 解析を試みた。この結果、通常見られる C14~C18 脂肪酸のほか、C16~C22 の多価不飽和脂肪酸(C16:3、C16:4、C18:3、C18:4、C20:4、C20:5、C22:4、C22:5、C22:6)の存在を確認した。一方、ヒドロキシ及びエポキシ脂肪酸は認められなかった。現在、更に 500 株以上の藻類株について解析を継続している。

更により効率的な脂質解析法の構築・活用を目指してLC/MSによる網羅的脂質解析の検討を行っており、中性及び極性脂質の一斉解析の可能性を見出して最適化検討を進めている。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Naoki Sato, “Scientific Elan Vital: Entropy Deficit or Inhomogeneity as a Unified Concept of Driving Forces of Life in Hierarchical Biosphere Driven by Photosynthesis.”, *Entropy*, vol. 14, No. 2, pp.233-251, 2012
(DOI: 10.3390/e14020233)